

Xác định một số đặc tính sinh học và đánh giá khả năng sinh miễn dịch của hai chủng parvovirus phân lập tại Việt Nam

Trịnh Thị Thu Hằng^{1*}, Vũ Khắc Minh Dương¹, Đỗ Văn Tấn², Phạm Trung Hiếu¹, Vũ Khắc Hùng¹

¹Bộ môn Công nghệ Sinh học, Phân viện Thú y miền Trung, 227 đường 2/4, phường Bắc Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa, Việt Nam

²Bộ môn Nghiên cứu vi rút, Phân viện Thú y miền Trung, 227 đường 2/4, phường Bắc Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa, Việt Nam

Ngày nhận bài 28/8/2024; ngày chuyển phân biện 3/9/2024; ngày nhận phân biện 24/9/2024; ngày chấp nhận đăng 30/9/2024

Tóm tắt:

Trong nghiên cứu này, 2 chủng (VC5 và TX7) có độc lực cao trong số 32 chủng parvovirus phân lập từ 6 tỉnh (Thái Bình, Thanh Hóa, Bình Định, Đắk Lắk, Bình Dương và Đồng Nai) (trước sáp nhập) được tuyển chọn để xác định một số đặc tính sinh học và đánh giá khả năng sinh miễn dịch. Kết quả phân tích trình tự đoạn gen *NS1* cho thấy, cả 2 chủng VC5 và TX7 cùng thuộc tuýp porcine parvovirus 1 (PPV1) và tương đồng 99,70% về trình tự nucleotide với chủng PPV1 từ Trung Quốc (PPV1-0225-L-SD). Điều kiện nuôi cấy thích hợp nhất đối với 2 chủng porcine parvovirus (PPV) trên tế bào PK15 là môi trường EMEM có bổ sung 5% FBS, 1% kháng sinh Pen/Strep ở nhiệt độ 37°C và 5% CO₂. Ở 21 ngày sau miễn dịch lần 2, hiệu giá HI trung bình của lợn miễn dịch là 7,33 và 7,66 log₂ đối với nhóm miễn dịch VC5 và TX7, theo thứ tự; không phát hiện kháng thể ở nhóm đối chứng. Khi thử thách với chủng parvovirus cường độc, trên 80% thai lợn ở nhóm được gây miễn dịch sống và dưới 10% số thai lợn phát hiện sự có mặt của PPV. Trong khi đó, ở nhóm đối chứng, 100% thai lợn chết, 75% thai lợn chết có các biểu hiện khô thai và 90% thai lợn ở nhóm đối chứng phát hiện sự có mặt của PPV.

Từ khóa: điều kiện nuôi cấy, miễn dịch, parvovirus, phân tích gen.

Chỉ số phân loại: 1.6, 2.8, 4.3

Determination of some biological characteristics and evaluation of immunogenicity of two parvovirus isolates in Vietnam

Thi Thu Hang Trinh^{1*}, Khắc Minh Duong Vu¹, Văn Tấn Đỗ², Trung Hiếu Phạm¹, Khắc Hùng Vũ¹

¹Department of Biotechnology, Institute of Veterinary Research and Development of Central Vietnam, 227 2/4 Street, Bac Nha Trang Ward, Khanh Hoa Province, Vietnam

²Department of Virology, Institute of Veterinary Research and Development of Central Vietnam, 227 2/4 Street, Bac Nha Trang Ward, Khanh Hoa Province, Vietnam

Received 28 August 2024; revised 24 September 2024; accepted 30 September 2024

Abstract:

In this study, two highly virulent strains (VC5 and TX7) among 32 parvovirus strains isolated from six provinces (Thai Binh, Thanh Hoa, Binh Dinh, Dak Lak, Binh Duong, and Dong Nai) (prior to the administrative merger) were selected to determine some biological characteristics and assess the immunogenicity. Sequence analysis of the *NS1* gene fragment revealed that both VC5 and TX7 strains belong to the porcine parvovirus 1 (PPV1) type and share 99.70% nucleotide sequence identity with the PPV1 strain from China (PPV1-0225-L-SD). The optimal culture conditions for the two porcine parvovirus (PPV) strains on PK15 cells were EMEM medium supplemented with 5% FBS and 1% Penicillin-Streptomycin antibiotic (Pen/Strep), incubated at 37°C and 5% CO₂. 21 days after the second immunisation, the average HI titer of the immunised pigs was 7.33 and 7.66 log₂ for the VC5 and TX7 immunised groups, respectively, while no antibodies were detected in the control group. Upon challenge with a highly virulent parvovirus strain, over 80% of the fetuses in the immunised groups survived, and less than 10% of the fetuses were detected with PPV. In contrast, in the control group, 100% of the fetuses died, with 75% showing signs of mummification and 90% testing positive for PPV.

Keywords: culture conditions, gene analysis, immunity, parvovirus.

Classification numbers: 1.6, 2.8, 4.3

*Tác giả liên hệ: Email: hangdhnt@gmail.com

1. Đặt vấn đề

Chăn nuôi lợn là một ngành mũi nhọn trong tăng trưởng và phát triển kinh tế quốc dân. Theo Tổng cục Thống kê (tháng 4/2024), trong năm 2023, Việt Nam có khoảng 25,5 triệu con lợn, trong đó có khoảng 3,1 triệu lợn nái sinh sản. Bệnh khô thai do parvovirus là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm ở lợn nái với các biểu hiện lâm sàng chỉ thấy ở lợn nái như: chết lưu thai, thai gỗ, thai thối, hoặc lợn con đẻ ra có sức sống rất kém. Đây là một bệnh gây thiệt hại lớn cho các trại giống lợn sinh sản, làm giảm 50-60% số đầu lợn con sơ sinh, giảm khối lượng ở lợn con lúc cai sữa và tăng chi phí khắc phục hậu quả do bệnh gây ra [1]. Bệnh khô thai là bệnh gây tổn hại nghiêm trọng cho ngành chăn nuôi. PPV là nguyên nhân phổ biến và quan trọng nhất dẫn đến bệnh sảy thai trên lợn [2, 3]. Vì vậy, việc phân lập và nghiên cứu về các đặc tính của parvovirus tại Việt Nam là hết sức cần thiết.

Việc hiểu rõ về các đặc tính sinh học của các chủng parvovirus ở Việt Nam sẽ giúp phát triển các công cụ chẩn đoán, vắc xin và các chiến lược điều trị hiệu quả. Trong bộ gen của PPV, *NSI* là protein phi cấu trúc quan trọng nhất. Gen *NSI* có độ bảo tồn cao và rất cần thiết cho quá trình sao chép DNA của PPV [4]. *NSI* là một protein đa chức năng, được đặc trưng bởi các hoạt động endonuclease, DNA helicase và ATPase, và khả năng liên kết cộng hóa trị với đầu 5' của DNA virus bộ gen. Protein *NSI* cũng là yếu tố chính góp phần vào quá trình điều hòa phiên mã, có vai trò gây bệnh cho tế bào vật chủ [5].

Bên cạnh đó, việc lựa chọn môi trường nuôi cấy tối ưu nhất cho parvovirus cũng là một bước thiết yếu trong quá trình nghiên cứu và phát triển vắc xin. Môi trường nuôi cấy thích hợp giúp tối đa hóa sản lượng virus, giảm chi phí và thời gian sản xuất vắc xin. Hơn nữa, môi trường nuôi cấy tối ưu sẽ giảm nguy cơ gây biến đổi không mong muốn của virus.

Cho đến nay, ở Việt Nam chưa có đơn vị nào phát triển thành công vắc xin parvovirus. Các vắc xin được sử dụng để phòng bệnh khô thai do parvovirus đang được lưu hành tại Việt Nam đều là nhập khẩu, như Parvovax (Pháp), PPV-VAC (Hàn Quốc)..., thường có giá cao. Các chủng sử dụng để sản xuất vắc xin là những chủng phân lập từ nước ngoài, có thể không tương đồng kháng nguyên với các chủng phân lập ở Việt Nam, dẫn đến vắc xin kém hiệu quả. Vì vậy, việc phân lập và tuyển chọn chủng parvovirus đang lưu hành tại Việt Nam có tính kháng nguyên mạnh để nghiên cứu chế tạo một loại vắc xin phòng bệnh khô thai ở lợn sinh sản có tầm quan trọng đặc biệt. Điều này giúp chủ động nguồn vắc xin phòng bệnh do parvovirus một cách hiệu quả, góp phần phát triển chăn nuôi lợn của Việt Nam. Việc đánh giá tính sinh miễn dịch của parvovirus là một bước quan trọng và không thể thiếu trong quá trình phát triển vắc xin. Chỉ khi hiểu rõ được tính sinh miễn dịch mới có thể nghiên cứu tối ưu hóa sao cho vắc xin đạt được hiệu quả bảo vệ cao nhất.

Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện phân tích đoạn gen *NSI*, tối ưu hóa môi trường nuôi cấy và xác định tính sinh miễn dịch của hai chủng parvovirus độc lực cao đã được phân lập trong nghiên cứu trước đó [6].

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Hai chủng VC5 (Đồng Nai), TX7 (Thanh Hóa) có độc lực cao [6] được tuyển chọn từ 32 chủng parvovirus phân lập từ 6 tỉnh Thái Bình, Thanh Hóa, Bình Định, Đắk Lắk, Bình Dương và Đồng Nai được sử dụng để nghiên cứu phân tích đoạn gen *NSI*, tối ưu hóa môi trường nuôi cấy và xác định tính sinh miễn dịch.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu này thuộc đề tài: “Nghiên cứu chế tạo vắc xin nhĩ giá vô hoạt phòng bệnh khô thai do parvovirus và đóng dấu do vi khuẩn *Erysipelothrix rhusiopathiae* gây ra ở lợn”. Các nghiên cứu trên động vật của đề tài đã được chấp thuận bởi Hội đồng y đức động vật Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh theo giấy chứng nhận số NLU-230313 ngày 24/5/2023 [7].

2.2.1. Phân tích trình tự đoạn gen *NSI*

DNA virus được tách chiết bằng bộ kit MagMAX Viral Pathogen Kit (Thermo Fisher Scientific). Theo K.S. Lyoo và cs (2001) [8], đoạn gen *NSI* (330 bp) được nhân lên bằng phản ứng chuỗi polymerase (PCR) với cặp mồi đặc hiệu PPVF: 5'-ATA CAA TTC TAT TTC ATG GGC CAG C-3', PPVR: 5'-TAT GTT CTG TTT CCT CGC ATC-3'. Thành phần cho 25 µl gồm: 9 µl nước (nuclease-free), 12,5 µl 2X Taq PCR Master Mix, 0,5 µl mồi PPVF, 0,5 µl mồi PPVR, 2,5 µl DNA. Phản ứng PCR gồm 1 chu kỳ 94°C - 2 phút, 30 chu kỳ 94°C - 45 giây, 55°C - 60 giây, 72°C - 90 giây, 1 chu kỳ 72°C - 10 phút. Đoạn gen *NSI* sau đó được gửi giải trình tự tại Công ty Firstbase (Singapore). Trình tự được phân tích bằng BLAST trên Ngân hàng Gen NCBI. Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên trình tự đoạn gen *NSI* của chủng TX7, VC5 với một số chủng đã công bố trên Ngân hàng Gen (GenBank) bằng chương trình MEGA6, theo phương pháp kết nối liền kề (Neighbour-Joining) [9], sử dụng độ tin cậy 1000 bootstrap [10].

2.2.2. Xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp cho hai chủng VC5 và TX7

Đường chuẩn xác định số lượng bản sao virus dựa trên giá trị Ct của phản ứng Real-time PCR được thực hiện theo mô tả của L.F. Miao và cs (2009) [11].

Dựa trên các kết quả nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã chọn các điều kiện nghiên cứu bao gồm nhiệt độ 33, 37 và 39°C, kết hợp với các tỷ lệ FBS là 2, 3 và 5%, được bổ sung vào môi trường EMEM [8, 12-15]. Trong các nghiên cứu về nuôi cấy parvovirus, tỷ lệ kháng sinh và nồng độ CO₂ luôn được sử dụng là 1% kháng sinh và 5% CO₂. Vì vậy, các chỉ tiêu về tỷ lệ kháng sinh và nồng độ CO₂ được giữ cố định trong quá trình khảo sát.

Chủng virus được gây nhiễm lên tế bào PK15 với MOI=0,01. Sau đó, virus được nuôi trong các điều kiện khác nhau và thu mẫu sau mỗi 24 giờ trong 7 ngày sau gây nhiễm. Số lượng bản sao virus tại mỗi thời điểm thu mẫu được xác định bằng phản ứng Real-time PCR [11].

2.2.3. Xác định tính sinh miễn dịch

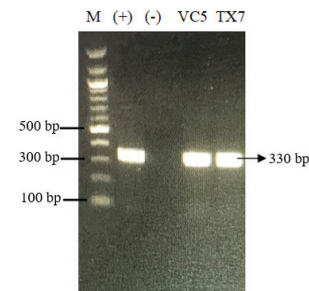
Chín lợn nái hậu bị khỏe mạnh, không nhiễm PPV và không có kháng thể kháng PPV được chia thành 3 nhóm (3 con/1 nhóm). Nhóm 1 được gây miễn dịch bằng chủng VC5, nhóm 2 được gây miễn dịch bằng chủng TX7 và nhóm 3 được tiêm PBS (nhóm đối chứng). Lợn được gây miễn dịch với liều 10^6 TCID₅₀ virus đã được bất hoạt với 5 mM Binary ethylenimine [16] và được kiểm tra bất hoạt bằng cách gây nhiễm lên tế bào PK15, trong vòng 7 ngày không quan sát thấy sự xuất hiện bệnh tích tế bào. Virus sau bất hoạt 100% được phối trộn với 20% chất bổ trợ keo phèn qua đường tiêm bắp. Mũi 1 được tiêm vào ngày 35 trước phối giống. Mũi miễn dịch thứ hai cách mũi một 21 ngày. Sau 2 mũi tiêm, lợn được lấy máu vào các ngày 7, 14, 21 và xác định hiệu giá kháng thể bằng phản ứng HI. Tại ngày 40 của thai kỳ, lợn được công cường độc với liều 4×10^6 TCID₅₀. Ngày thứ 90 của kỳ mang thai, các lợn thí nghiệm được mổ khám, thu dạ con để kiểm tra hình thái, bệnh tích trên phôi thai [16]. Sự có mặt của PPV trong mẫu phôi thai được xác định bằng phản ứng Real-time PCR [11].

Lợn được chăn nuôi trong khu vực nhà chăn nuôi động vật thí nghiệm đạt chuẩn GLP tại Phân viện Thú y miền Trung. Thức ăn được cung cấp theo Quyết định số 217/QĐ-BNN-KHCN ngày 14/1/2021 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (nay là Bộ Nông nghiệp và Môi trường) về định mức kinh tế - kỹ thuật đối với hoạt động khoa học và công nghệ trong lĩnh vực chăn nuôi, thú y. Lợn được gây mê bằng Zoletil với liều 0,1 mg/kg thể trọng trước khi giết mổ để tránh sợ hãi, đau đớn cho vật nuôi. Sau khi giết mổ, động vật được tiêu hủy bằng phương pháp đốt. Khử trùng trong và ngoài chuồng trại bằng Virkon.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả phân tích đoạn gen NS1

Sau khi đã phân lập, 2 chủng parvovirus VC5 và TX7 sẽ được xác định mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự đoạn gen NS1. Chúng tôi đã nhận lên thành công đoạn gen 330 bp (đoạn gen có vị trí từ 1.453 đến 1.782 trên gen NS1) như ở hình 1. Đoạn gen này là vùng có độ bảo tồn cao giữa các chủng từ PPV1-PPV6 và được dùng để ghi nhận tỷ lệ nhiễm PPV [8]. NS1 là protein phi cấu trúc chính được bảo tồn cao và rất cần thiết cho quá trình sao chép DNA PPV. NS1 là một protein đa chức năng được đặc trưng bởi các hoạt động endonuclease, DNA helicase và ATPase và khả năng liên kết cộng hóa trị với đầu 5' của DNA virus bộ gen [17]. Nhiều nghiên cứu về PPV sử dụng việc phân tích trình tự gen NS1 để nghiên cứu về sự tiến hóa và phát sinh loài của PPV. X. Hao và cs (2011) [18] đã sử dụng trình tự gen NS1 của 23 chủng parvovirus để tiến hành phân tích, nhằm phân nhóm và xây dựng dữ liệu phân tử về các chủng PPV phân lập tại Trung Quốc. Một nghiên cứu khác tại Trung Quốc của H. Deng và cs (2024) [19] cũng sử dụng cây phân loại dựa trên trình tự gen NS1 để phân loại và xác định mối quan hệ di truyền của 2 chủng PPV1 mới phân lập (HLJ202108-Y, SDLC202109). Để phân tích tiến hóa di truyền của chủng PPV7 phân lập tại Phúc Kiến, Trung Quốc, trình tự gen NS1 cũng được sử dụng để phân tích mối quan hệ tiến hóa trong nghiên cứu của Z. Lyu và cs (2023) [20].



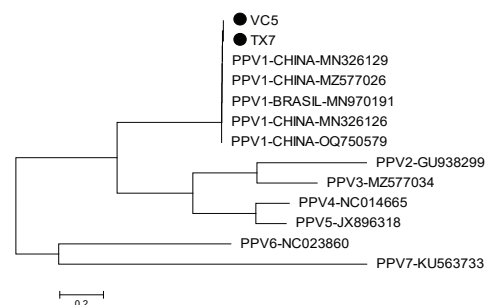
Hình 1. Kết quả phản ứng chuỗi polymerase nhân lên đoạn gen NS1. M: thang đo; (+): đối chứng dương; (-): đối chứng âm; VC5: chủng VC5; TX7: chủng TX7.

Trong nghiên cứu này, trình tự gen NS1 cũng được chúng tôi sử dụng để phân tích mối quan hệ di truyền của 2 chủng parvovirus VC5 và TX7 với các chủng tham chiếu có trên Ngân hàng Gen NCBI.

Hai chủng VC5 và TX7 được xác định mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự đoạn gen NS1. Đoạn gen này là vùng có độ bảo tồn cao giữa các chủng PPV [8]. Với kết quả phân tích độ tương đồng trong trình tự nucleotide của đoạn gen NS1, chúng tôi thấy rằng, 2 chủng VC5 và TX7 có tỷ lệ tương đồng 100% với nhau. Trình tự gen NS1 của 2 chủng này cũng tương đồng từ 99,39 đến 99,70% với một số chủng PPV1 từ Trung Quốc và Brazil. Trong đó, tương đồng cao nhất với chủng PPV1-0225-L-SD (99,70%) được phân lập tại Trung Quốc năm 2022 (bảng 1).

Bảng 1. Tỷ lệ tương đồng đoạn gen NS1 của chủng VC5 và TX7 với một số chủng tham chiếu trên Ngân hàng Gen NCBI.

TT	Chủng	TX7 (%)	VC5 (%)
1	VC5	100	
2	TX7		100
3	PPV1-HuB78-2017 (Trung Quốc) (Mã số GenBank: MN326129)	99,39	99,39
4	PPV1-GD10-1999 (Trung Quốc) (Mã số GenBank: MN326126)	99,39	99,39
5	PPV1-JSYZ20170418-30 (Trung Quốc) (Mã số GenBank: MZ577026)	99,39	99,39
6	PPV1/BRA-UEL/GO-1074/2018 (Brazil) (Mã số GenBank: MN970191)	99,39	99,39
7	PPV1-0225-L-SD (Trung Quốc) (Mã số GenBank: OQ750579)	99,70	99,70



Hình 2. Cây phả hệ dựa trên đoạn gen NS1.

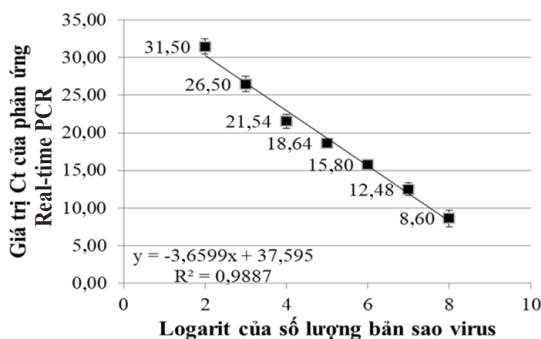
Kết quả phân tích cây phả hệ dựa trên đoạn gen *NS1* (hình 2) chỉ ra rằng, 2 chủng VC5, TX7 trong nghiên cứu này đều thuộc tuýp PPV1 và cùng nhóm phân bố với một số chủng PPV1 phân lập tại Trung Quốc.

Mức độ lưu hành chủng PPV1 tại Việt Nam là khá cao. Năm 2020, một nghiên cứu tại Việt Nam cho thấy, 88,2% (60/68) mẫu huyết thanh thu thập từ các trang trại chăn nuôi ở 6 tỉnh, bao gồm Hà Nội, Bắc Ninh, Hưng Yên, Phú Thọ (Vĩnh Phúc, Hòa Bình) và Hải Dương, đều có chứa kháng thể kháng PPV1. Phân tích di truyền của 10 mẫu sử dụng gen mã hóa protein *NS1* đã xác nhận các chủng này đều thuộc PPV1 [21]. Mặt khác, các loại vắc xin trên thị trường hiện nay chủ yếu phát triển dựa trên chủng PPV1. Vắc xin Porcilis® Parvo (vắc xin vô hoạt - Hà Lan), Eryseng® Parvo (vắc xin vô hoạt - Tây Ban Nha), ReproCyc® ParvoFLEX (vắc xin tiêu phân - Đức) đều sử dụng kháng nguyên từ chủng PPV1 [22]. Nhiều nghiên cứu về vắc xin PPV tiêu phân cũng được thực hiện trên chủng PPV1. K.N. Cho và cs (2023) [23] đã tiến hành nghiên cứu phát triển vắc xin tiêu phân phòng bệnh do parvovirus gây ra trên lợn sử dụng protein VP2 của chủng PPV1-28. Một nghiên cứu khác của Z. Ling và cs (2023) [24] cũng phát triển vắc xin tiêu phân từ protein VP2 của chủng PPV1. 2 chủng VC5 và TX7 đều thuộc PPV1, do đó các chủng này có tiềm năng cao trong việc sử dụng để nghiên cứu phát triển vắc xin.

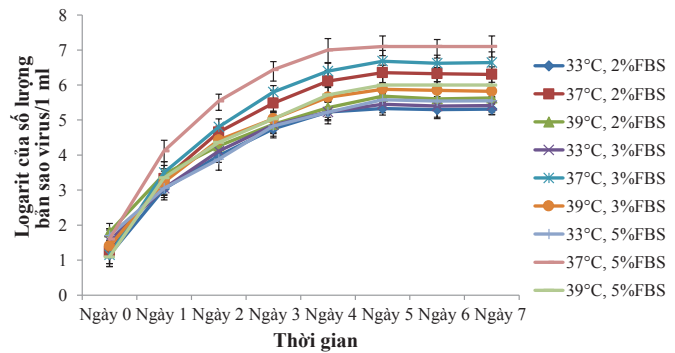
Cho đến đầu những năm 2000, những thay đổi di truyền của bộ gen PPV vẫn chưa được nghiên cứu một cách có hệ thống [25]. Sang thế kỷ 21, các nghiên cứu về biến chủng của parvovirus mới được chú ý. Tỷ lệ đột biến của gen VP vào khoảng $3-5 \times 10^{-4}$ đột biến/nucleotide/năm, trong khi đó, đột biến ở gen NS vào khoảng 10^{-5} đột biến/nucleotide/năm [26]. Như vậy, có thể thấy rằng việc phân lập các chủng PPV đang lưu hành tại Việt Nam là hết sức cần thiết. Hai chủng VC5 và TX7 được phân lập trong nghiên cứu này có thể là nguồn chủng hữu ích cho nghiên cứu sâu hơn về sản xuất vắc xin parvovirus tại Việt Nam.

3.2. Kết quả xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp với hai chủng VC5 và TX7

Với kết quả Real-time PCR và đường chuẩn (hình 3), chúng tôi xác định được số lượng bản sao virus tại mỗi thời điểm thu mẫu. Kết quả đó được ghi nhận và xây dựng biểu đồ như trong hình 4.



Hình 3. Đường chuẩn xác định số lượng bản sao virus.



Hình 4. Biểu đồ khảo sát điều kiện nuôi cấy parvovirus.

Từ biểu đồ khảo sát điều kiện nuôi cấy như ở hình 4, chúng tôi thấy rằng, số logarit của lượng bản sao virus tại nhiệt độ 33 và 39°C thấp hơn tại nhiệt độ 37°C. Như vậy, nhiệt độ thích hợp nhất với PPV trong nghiên cứu này là 37°C. Số lượng bản sao virus đạt cao nhất tại điều kiện 37°C, 5% FBS.

Từ kết quả trên, chúng tôi xác định được điều kiện nuôi cấy thích hợp nhất đối với 2 chủng PPV (VC5 và TX7) trên tế bào PK15 là môi trường EMEM có bổ sung 5% FBS, 1% kháng sinh Pen/Strep ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂.

3.3. Kết quả xác định tính sinh miễn dịch của 2 chủng VC5 và TX7

Hiệu giá HI của các nhóm lợn thí nghiệm được đánh giá và thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Hiệu giá HI trên lợn sau tiêm 2 mũi miễn dịch theo thời gian.

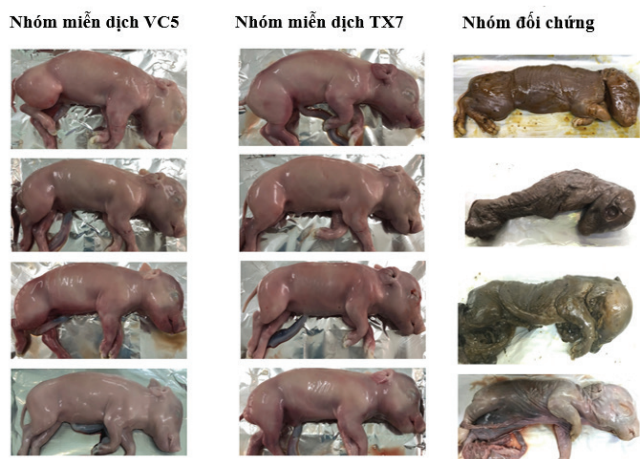
Nhóm thí nghiệm	Hiệu giá HI trung bình			
	Ngày 0	Ngày 7	Ngày 14	Ngày 21
Nhóm miễn dịch VC5	3,33	4,33	5,66	7,33
Nhóm miễn dịch TX7	3,66	4,66	6,33	7,66
Nhóm đối chứng (PBS)	0	0	0	0

Kết quả hiệu giá HI cho thấy, lợn miễn dịch có hiệu giá HI trung bình tăng dần (bảng 2). Tại ngày 0 (trước khi tiêm mũi 2), hiệu giá HI trung bình với nhóm VC5 và TX7 lần lượt đạt 3,33 và 3,66 log₂. Tại ngày thứ 21, sau mũi 2, hiệu giá HI trung bình đạt 7,33 log₂ với nhóm VC5; 7,66 log₂ với nhóm TX7. Trong khi đó, suốt quá trình thí nghiệm, không phát hiện được kháng thể kháng PPV (HI=0) ở nhóm đối chứng PBS. Kết quả này tương tự nghiên cứu của P.S. Paul và cs (1986) [27], sau liều tiêm thứ nhất hiệu giá HI tăng lên không đáng kể. Hai liều vắc xin mang lại hiệu quả miễn dịch tốt hơn và lâu dài hơn đối với vắc xin PPV bất hoạt. Nghiên cứu của E.V.D. Born và cs (2020) [28] khảo sát tính sinh miễn dịch của vắc xin tam giá Ery + Parvo + Lepto cũng sử dụng 2 mũi tiêm và chỉ ra rằng, kháng thể xuất hiện sớm từ ngày thứ 6 và đạt đỉnh vào ngày 21 sau tiêm 2 mũi miễn dịch. Một nghiên cứu khác của K.J. Sørensen và cs (1981) [29] cũng sử dụng vắc xin PPV vô hoạt với 2 mũi tiêm để gây đáp ứng miễn dịch và cho kết quả HI từ 7 đến 9 log₂ sau 2-3 tuần tiêm mũi 2.

Kết quả thử thách với chủng PPV cường độc của các nhóm thí nghiệm được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả bảo hộ thai lợn sau công cường độc.

Nhóm thí nghiệm	Lợn nái	Tổng số thai lợn	Khả năng sống sót của thai lợn sau công cường độc			Thai lợn dương tính PPV sau công cường độc
			Sống	Chết		
				Không có biểu hiện khô thai	Khô thai	
Nhóm miễn dịch VC5	Lợn số 1	8	6	2	0	1
	Lợn số 2	7	5	2	0	1
	Lợn số 3	7	7	0	0	0
Tỷ lệ (%)		100	81,82	18,18	0	9,09
Nhóm miễn dịch TX7	Lợn số 4	6	6	0	0	0
	Lợn số 5	8	6	2	0	1
	Lợn số 6	7	6	1	0	1
Tỷ lệ (%)		100	85,71	14,29	0	9,52
Nhóm đối chứng	Lợn số 7	7	0	2	5	6
	Lợn số 8	7	0	1	6	6
	Lợn số 9	6	0	2	4	6
Tỷ lệ (%)		100	0	25	75	90



Hình 5. Thai lợn sau công cường độc.

Sau khi công cường độc, nhóm được gây miễn dịch VC5 có 18/22 (81,82%) thai sống, nhóm được tiêm miễn dịch TX7 có 18/21 (85,71%) thai sống, trong khi 100% thai lợn của nhóm đối chứng chết và có bệnh tích điển hình (bảng 3). 75% (15/20) thai lợn có các biểu hiện như thai bị hấp thu nước, khô, cứng lại và chuyển màu thành màu đen, kích thước nhỏ hơn so với các thai bình thường (hình 5). Phát hiện sự có mặt của PPV ở 90% thai lợn của nhóm đối chứng, trong khi chỉ 2/22 (9,09%) và 2/21 thai lợn (9,52%) được phát hiện PPV ở nhóm miễn dịch VC5 và TX7, theo thứ tự. Kết quả này cũng tương đương với kết quả của một số nghiên cứu khác về vắc xin PPV vô hoạt.

Nghiên cứu của K.J. Sørensen và cs (1981) [29] cho kết quả 50/65 (76,92%) thai nhiễm virus và 43/65 (66,15%) thai chết ở nhóm không tiêm vắc xin, 100% thai sống ở nhóm tiêm vắc xin sau khi công cường độc với liều 1×10^7 TCID₅₀ chủng PPV 839. E.V.D. Born và cs (2020) [28] cũng cho thấy, 69% thai lợn chết, 90% phát hiện PPV ở nhóm không tiêm vắc xin; 100% lợn sống và 10% phát hiện PPV ở nhóm tiêm vắc xin. I. Kiss và cs (2020) [30] nghiên cứu khả năng bảo hộ của vắc xin Parvoruvax® và 3 loại vắc xin PPV thương mại (vắc xin B, vắc xin C, vắc xin D). Kết quả cho thấy, sau công cường độc với liều $4 \times 10^{5.5}$ TCID₅₀ chủng PPV1-HUN, 100% thai lợn sống với nhóm tiêm vắc xin Parvoruvax®; 89, 92 và 64% lần lượt là tỷ lệ thai lợn sống với nhóm vắc xin B, vắc xin C, vắc xin D; 40% thai lợn sống sau công cường độc ở nhóm đối chứng.

Kết quả trên cho thấy, 2 chủng VC5 và TX7 có khả năng gây đáp ứng miễn dịch tốt trên lợn hậu bị, lợn mang thai và có khả năng bảo hộ 81,82% (chủng VC5) và 85,71% (chủng TX7) thai sống, trong khi 100% thai lợn chết ở nhóm đối chứng PBS và có biểu hiện đặc trưng của bệnh. 2 chủng VC5, TX7 có tiềm năng tốt và sẽ được sử dụng trong các nghiên cứu để lựa chọn liều kháng nguyên, chất bổ trợ thích hợp để phát triển vắc xin phòng bệnh do PPV trong thời gian tới.

4. Kết luận

Hai chủng VC5, TX7 có trình tự nucleotide của đoạn gen 330 bp *NS1* tương đồng 100% với nhau, đồng thời tương đồng trên 99% với một số chủng PPV1 từ Trung Quốc và Brazil. Trong đó, tương đồng cao nhất (99,70%) với chủng PPV1-0225-L-SD được phân lập tại Trung Quốc năm 2022. Điều kiện nuôi cấy thích hợp nhất đối với hai chủng PPV (VC5 và TX7) trên tế bào PK15 là môi trường EMEM có bổ sung 5% FBS, 1% kháng sinh Pen/Strep ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂.

Tỷ lệ bảo hộ thai ở nhóm tiêm miễn dịch VC5 và TX7 lần lượt là 81,82 và 85,71%, trong khi 100% thai lợn ở nhóm đối chứng đều chết. Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu trước đó về vắc xin PPV vô hoạt. Như vậy, hai chủng VC5 và TX7 có tiềm năng sử dụng cho nghiên cứu sản xuất vắc xin phòng bệnh PPV hiệu quả.

Đây là những kết quả bước đầu về phân lập chủng virus, xác định nguồn gốc chủng, điều kiện nuôi cấy và đặc tính sinh miễn dịch. Kết quả này là một phần của đề tài “Nghiên cứu chế tạo vắc xin nhĩ giá vô hoạt phòng bệnh khô thai do parvovirus và đóng dấu do vi khuẩn *Erysipelothrix rhusiopathiae* gây ra ở lợn”. Để đánh giá toàn diện hơn các chủng parvovirus phân lập được, chúng tôi sẽ tiếp tục đánh giá độ an toàn và ổn định của chủng giống vắc xin, lựa chọn chất bổ trợ cũng như đánh giá hiệu quả của vắc xin trong những nghiên cứu tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] B.H. Nguyen, T.M.L. Huynh (2010), *Veterinary Infectious Diseases Textbook*, Agricultural Publishing House, 644pp (in Vietnamese).
- [2] S.L. Pham, H.N. Nguyen (2015), *Diseases Transmitted from Animals to Humans*, Agricultural Publishing House, 366pp (in Vietnamese).
- [3] N.H. Nguyen, T.D. Do (2018), *Important and Emerging Infectious Diseases in Pigs*, Agricultural Publishing House, 200pp (in Vietnamese).
- [4] Q. Xie, J. Wang, C. Gu, et al. (2023), “Structure and function of the parvoviral NS1 protein: A review”, *Virus Genes*, **59**(2), pp.195-203, DOI: 10.1007/s11262-022-01944-2.
- [5] S. Fernandes, M. Boisvert, J. Szelei, et al. (2014), “Differential replication of two porcine parvovirus strains in bovine cell lines ensues from initial DNA processing and NS1 expression”, *Journal of General Virology*, **95**, pp.910-921, DOI: 10.1099/vir.0.059741-0.
- [6] T.T.H. Trinh, V.T. Do, V.K. Do, et al. (2024), “Isolation and characterization of porcine parvovirus in Vietnam”, *Veterinary World*, **17**(7), pp.1530-1537, DOI: 10.14202/vetworld.2024.1530-1537.
- [7] Nong Lam University - Ho Chi Minh City (2023), *Certificate of Animal Medical Ethics No. NLU-230313* (in Vietnamese).
- [8] K.S. Lyoo, Y.H. Park, B.K. Park (2001), “Prevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus from aborted fetuses and pigs with respiratory problems in Korea”, *Journal of Veterinary Science*, **2**(3), pp.201-207.
- [9] N. Saitou, M. Nei (1987), “The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees”, *Molecular Biology and Evolution*, **4**, pp.406-425, DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
- [10] J. Felsenstein (1985), “Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap”, *Evolution*, **39**, pp.783-791, DOI: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x.
- [11] L.F. Miao, C.F. Zhang, C.M. Chen, et al. (2009), “Real-time PCR to detect and analyze virulent PPV loads in artificially challenged sows and their fetuses”, *Veterinary Microbiology*, **138**, pp.145-149, DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.02.006.
- [12] A.F. Streck, T. Homeier, T. Foerster, et al. (2013), “Analysis of porcine parvoviruses in tonsils and hearts from healthy pigs reveals high prevalence and genetic diversity in Germany”, *Archives of Virology*, **158**, pp.1173-1180, DOI: 10.1007/s00705-013-1603-0.
- [13] H.J. Kim, S.R. Kwon, K. Yuasa (2020), “Establishing the optimal fetal bovine serum concentration to support replication of cyprinid herpesvirus 3 in CCB and KF-1 cell lines”, *Journal of Virological Methods*, **276**, DOI: 10.1016/j.jviromet.2019.113733.
- [14] C.S. Choi, H.S. Joo, T.W. Molitor (1990), “Replication of two porcine parvovirus isolates at non-permissive temperatures”, *Archives of Virology*, **113**(3), pp.235-244, DOI: 10.1007/BF01316676.
- [15] P.A. Bachmann (1972), “Porcine parvovirus infection *in vitro*: A study model for the replication of parvoviruses I. Replication at different temperatures”, *Experimental Biology and Medicine*, **140**(4), pp.1369-1374, DOI: 10.3181/00379727-140-36676.
- [16] T. Foerster, A.F. Streck, S. Speck, et al. (2016), “An inactivated whole-virus porcine parvovirus vaccine protects pigs against disease but does not prevent virus shedding even after homologous virus challenge”, *Journal of General Virology*, **97**(6), pp.1408-1413, DOI: 10.1099/jgv.0.000446.
- [17] D.S.V. Bermudez, J.D. Mogollon, C.F. Rodriguez, et al. (2023), “The novel porcine parvoviruses: Current state of knowledge and their possible implications in clinical syndromes in pigs”, *Viruses*, **15**(12), DOI: 10.3390/v15122398.
- [18] X. Hao, Z. Lu, P. Sun, et al. (2011), “Phylogenetic analysis of porcine parvoviruses from swine samples in China”, *Virology Journal*, **8**(320), DOI: 10.1186/1743-422X-8-320.
- [19] H. Deng, G. Cong, H. Wang, et al. (2024), “Isolation, characterisation, and phylogenetic analysis of two new porcine parvovirus 1 isolates from Northern China”, *Virus Research*, **339**, DOI: 10.1016/j.virusres.2023.199247.
- [20] Z. Lyu, X. Zhang, S. Xue, et al. (2023), “Detection and genetic evolution analysis of porcine parvovirus type 7 (PPV7) in Fujian province”, *Infection, Genetics and Evolution*, **115**, DOI: 10.1016/j.meegid.2023.105515.
- [21] T.M.L. Huynh, V.G. Nguyen, T.N. Mai, et al. (2020), “Presence of porcine parvovirus 1 (PPV) in pigs in Hanoi and surrounding areas”, *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, **18**(7), pp.495-503 (in Vietnamese).
- [22] N. Vereecke, L.K. Kvisgaard, G. Baele, et al. (2022), “Molecular epidemiology of porcine parvovirus type 1 (PPV1) and the reactivity of vaccine-induced antisera against historical and current PPV1 strains”, *Virus Evolution*, **8**(1), DOI: 10.1093/ve/veac053.
- [23] K.N. Cho, I.O. Ouh, Y.M. Park, et al. (2023), “A plant-produced porcine parvovirus 1-82 VP2 subunit vaccine protects pregnant sows against challenge with a genetically heterologous PPV1 strain”, *Vaccines*, **11**(1), DOI: 10.3390/vaccines11010054.
- [24] Z. Ling, H. Zhang, Y. Chen, et al. (2023), “A subunit vaccine based on the VP2 protein of porcine parvovirus 1 induces a strong protective effect in pregnant gilts”, *Vaccines (Basel)*, **11**(11), DOI: 10.3390/vaccines11111692.
- [25] S. Duffy, L.A. Shackleton, E.C. Holmes (2008), “Rates of evolutionary change in viruses: Patterns and determinants”, *Nature Reviews Genetics*, **9**(4), pp.267-276, DOI: 10.1038/nrg2323.
- [26] X. Ren, Y. Tao, J. Cui, et al. (2013), “Phylogeny and evolution of porcine parvovirus”, *Virus Research*, **178**(2), pp.392-397, DOI: 10.1016/j.virusres.2013.09.014.
- [27] P.S. Paul, W.L. Mengeling (1986), “Vaccination of swine with an inactivated porcine parvovirus vaccine in the presence of passive immunity”, *Journal of The American Veterinary Medical Association*, **188**(4), pp.410-413, DOI: 10.2460/javma.1986.188.04.410.
- [28] E.V.D. Born, P.P.M.V.D. Elzen, E.V. Kilsdonk, et al. (2020), “An octavalent vaccine provides pregnant gilts protection against a highly virulent porcine parvovirus strain”, *BMC Veterinary Research*, **16**(1), 6pp, DOI: 10.1186/s12917-020-2272-3.
- [29] K.J. Sørensen, J. Askaa (1981), “Vaccination against porcine parvovirus infection”, *Acta Veterinaria Scandinavica*, **22**(2), pp.171-179, DOI: 10.1186/BF03547506.
- [30] I. Kiss, E. Kovács, Z. Zádori, et al. (2020), “Vaccine protection against experimental challenge infection with a PPV-27a genotype virus in pregnant gilts”, *Veterinary Medicine (Auckland, N.Z.)*, **11**, pp.17-24, DOI: 10.2147/VMRR.S236912.